

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-321262

(43)Date of publication of application : 24.11.2000

(51)Int.Cl.

G01N 31/00

C07F 9/28

G01N 21/78

(21)Application number : 11-134482

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 14.05.1999

(72)Inventor : NAGANO TETSUO
URANO YASUTERU

(54) FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING ACTIVATED ENZYME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To specifically detect peroxide species and to excite visible light by using a probe for detecting active oxygen where one benzene of triphenylphosphine is substituted with a visible light excitation fluorescent residual group.

SOLUTION: One of the triphenylphosphine of a probe for detecting active enzyme is substituted with a visible light excitation fluorescent residual group. The residual group of a fluoresceine analogous compound is used as the visible light excitation fluorescent residual group, and the fluoresceine analogous compound is preferably set to non-substitution hydroxyphenylfluorene. Since they react with hydroxyl radical extremely sensitively, a fluorescent oxidation group that is specific to a specific active oxygen species can be designed and the specific active oxygen species at a specific generation site can be detected by designing the combination of a reactive part and a fluorescent part.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.02.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3393220

[Date of registration] 31.01.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-321262

(P2000-321262A)

(43) 公開日 平成12年11月24日 (2000.11.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 31/00		G 0 1 N 31/00	K 2 G 0 4 2
C 0 7 F 9/28		C 0 7 F 9/28	2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 4 H 0 5 0

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平11-134482

(22) 出願日 平成11年5月14日 (1999.5.14)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年3月5日
日本薬学会第119年会組織委員会発行の「日本薬学会第
119年会講演要旨集 4」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 長野 哲雄

東京都杉並区天沼1-28-15

(72) 発明者 浦野 泰照

神奈川県川崎市高津区末長498 ドミール
梶ヶ谷204

(74) 代理人 100110168

弁理士 宮本 晴視

最終頁に続く

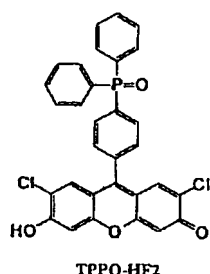
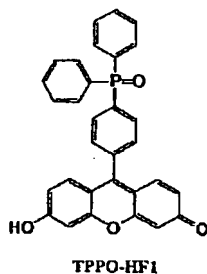
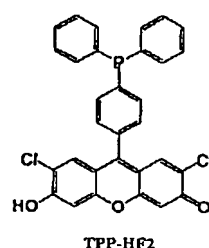
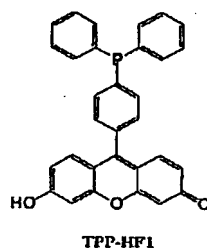
(54) 【発明の名称】 活性酸素検出用蛍光プローブ

(57) 【要約】

【目的】 過酸化物質を特異的に検出することが可能であり、可視光励起可能であり、かつイメージング観察が可能な蛍光プローブの提供

【構成】 トリフェニルホスフィンの1つのベンゼンを可視光励起蛍光残基で置換した活性酸素検出用蛍光性酸化プローブ、特に下記の構造式の蛍光性酸化プローブ。

【化1】



T P P - H F 、 T P P O - H F 類

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トリフェニルホスフィンの 1 つのベンゼンを可視光励起蛍光残基で置換した活性酸素検出用蛍光プローブ。

【請求項 2】 可視光励起蛍光基がフルオレセイン類似化合物の残基であることを特徴とする請求項 1 に記載の活性酸素検出用蛍光プローブ。

【請求項 3】 フルオレセイン類似化合物が未置換のヒドロキシフェニルフルオロンであることを特徴とする請求項 2 に記載の活性酸素検出用蛍光プローブ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、活性酸素などの酸化状態の変化、特に細胞や組織の酸化状態の変化を検出するプローブとして有用な長波長光励起が可能な蛍光性酸化プローブ、特に活性酸素と反応する有機リンを持つ蛍光性酸化プローブに関する。

【0002】

【従来技術】 従来から活性酸素を化学的に検出することを目的とした、蛍光あるいは化学発光試薬が開発されてきた。これらの試薬を用いた検出方法は感度が高く、生

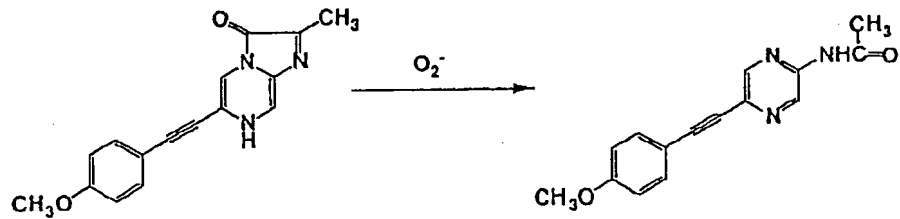
体に微量に生成し、かつ短寿命の活性酸素を検出する方法として非常に有効であるとされている。しかし、特定活性酸素種の特異的検出に関しては問題がある。すなわち、活性酸素の反応は多様であって、それぞれの活性酸素に独特の反応特性や基質特異性を持つと同時に、共通の反応性を示すことも多く、個々の活性酸素を特異的に検出する試薬の設計は非常に難しいので、反応種の特定には検出試薬を活性酸素阻害剤、例えばスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) やカタラーゼなどの酵素と共に使用する必要があり、間接的検出法といわれている。しかし、酵素は細胞膜を通過できないので、細胞内で生成している活性酸素の同定は難しいという問題点があった。これに対して、活性酸素に特異的な検出試薬を用いて、前記酵素のような補助試薬を要しない、直接的に活性酸素の種を検出する方法が提案され、そのような方法に有用な検出試薬の開発が行われてきた。そのような試薬として下記 1 の化合物などが提案されている。

【0003】

【化 1】

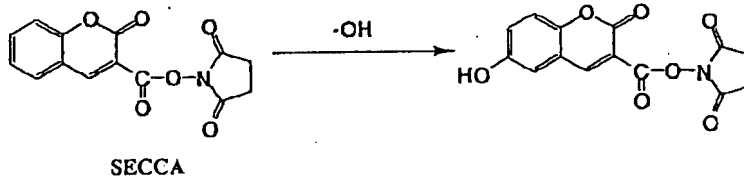
スーパーオキシド

化学発光



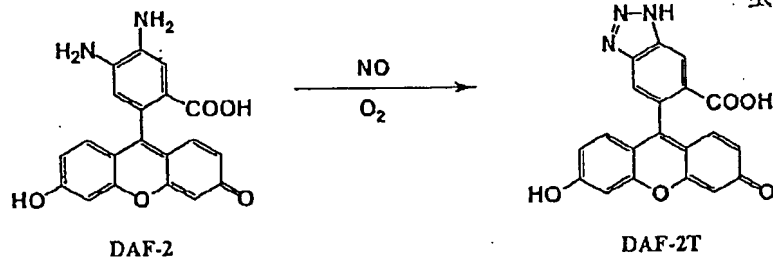
ヒドロキシラジカル

蛍光



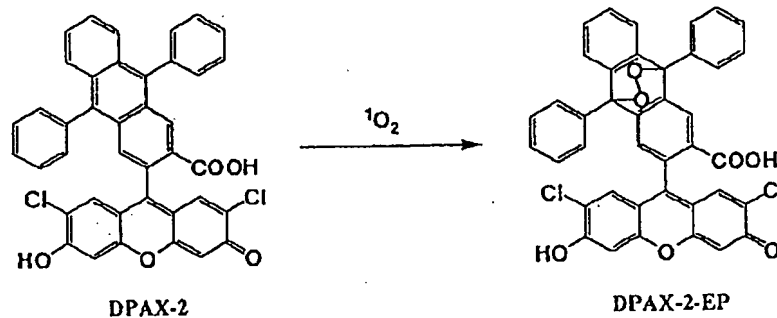
窒素酸化物

蛍光



一重項酸素

蛍光



活性酸素の特異的検出試薬

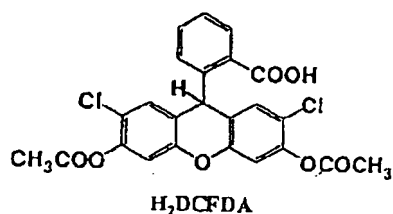
【0004】 活性酸素の生成は、生体内においては細胞やその集合体である組織において局所的で経時的酸化状態の変化であると考えることができ、活性酸素の生体内での動態を解明するには、生きたままの状態で細胞や組織中の活性酸素を検出することが必要である。そのような手法として、イメージングの手法が提案され、より生体の生理現象を忠実に、かつ生体にダメージを与えないで前記手法による観察が可能な試薬の開発などが行われている。

【0005】 このような試薬として、フルオレセイン (fluorescein) やローダミン (rhodamine) のジヒドロ体である下記2の化合物のジクロロジヒドロフルオレセイン (H2DCFDA=dichlorodihydrofluorescein) やジヒドロローダミン (dihydrorhodamine123) が提案されている。

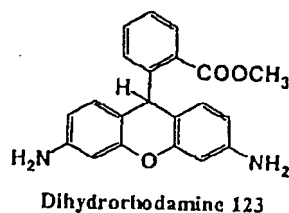
【0006】

【化2】

5



6



イメージングが可能な蛍光プローブ

【0007】前記例示の化合物は、完全な無色・無蛍光の化合物であるが、活性酸素によって酸化されると強い蛍光を有するフルオレセインやローダミンに変換され、かつ、これらは長波長励起が可能であるので、生体へのダメージが少なく、また共存するタンパク質の自家蛍光の影響がないので前記イメージングの手法に適しているといえる。更に、エステル化した誘導体は細胞膜を通過し、細胞内のエステラーゼによってもとの化合物に変換される。エステルが外れた状態では水溶性が高く細胞膜を通過できないので、色素は細胞内に留まることが可能となり、細胞内に局在した活性酸素の生成を調べることができる。また、ローダミンの場合にはプラスのチャージを有するため、細胞内では膜成分やミトコンドリアに集積することが知られており、この性質を利用して、ミトコンドリアで生成する活性酸素のイメージングを行った例がある。しかし特定の活性酸素種に特異的な試薬でないという欠点がある。

【0008】前記のように、様々な試薬が開発されてきたが、活性酸素に対する反応の特異性と、イメージングに要求される、長波長でかつ強い蛍光・発光を実現した例は一部を除いてほとんど存在しない。それゆえ、活性酸素、特に $\text{O}_2^{\cdot -}$ （スーパーオキシド）生成に起因する H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、あるいは生体成分の過酸化物を選択的に、好ましくは生きたままの状態で検出することが可能になれば、それらの生体への影響を知るうえで有益である。ところで、前記試薬は分子内に、活性酸素により酸化される部分（以降「反応部分」という場合がある。）と、前記酸化に伴って光の吸収や蛍光特性などが変わる部分（以降「蛍光団」という場合がある。）とが存在し、それらを過酸化物種を特異的に検出し得るようにするには反応部分が基質特異性を有しなければならない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、過酸化物種を特異的に検出することが可能であり、可視光励起可能であり、かつイメージング観察が可能な蛍光プローブを提供することである。ところで、トリフェニルホスフィン（Triphenylphosphine）または1つの

ベンゼン環をピレンに変えた化合物は、過酸化脂質などの過酸化物と効率よく反応することが知られており、その際吸光特性など光学特性が変化することから、その特性を過酸化脂質の検出試薬として利用する方法があり、吸光法によるHPLC分析に用いられた例も発表されている（U. Pinkernell, S. Effkemann, U. Karst: Anal. Chem., 69, 3623-3627 (1997)）。後者の化合物は酸化されることによって蛍光物質を生成する特性を利用した試薬として利用されているが、1. 親水性を持たない、2. 蛍光物質の励起波長が短波長である、及び3. 過酸化物種に対して特異性を有しないなどの点で、蛍光プローブとしては不十分であった。そこで、本発明者は、前記リン原子の過酸化物との反応と長波長光励起可能な蛍光化合物と組み合わせることによって、特異性も改善された蛍光プローブが得られるのではないかと考え、種々の化合物を合成し、その特性について検討した。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の要旨は、トリフェニルホスフィンの1つのベンゼン環を可視光励起蛍光残基で置換した活性酸素検出用蛍光プローブであり、好ましくは、前記可視光励起蛍光基をフルオレセイン類似化合物の残基としたことを特徴とする前記活性酸素検出用蛍光プローブであり、更に好ましくは、前記フルオレセイン類似化合物が未置換のヒドロキシフェニルフルオロンであることを特徴とする前記活性酸素検出用蛍光プローブである。本発明者は、活性酸素反応部位のトリフェニルホスフィン類と、長波長光励起の蛍光プローブとを組み合わせることにより、前記課題を解決したものである。

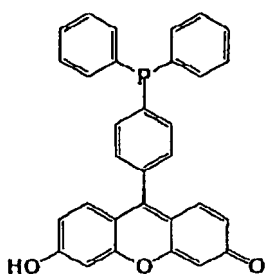
【0011】

【本発明の実施の態様】本発明を詳細に説明する。本発明TPP-HF類およびTPPO-HF類の化合物の合成

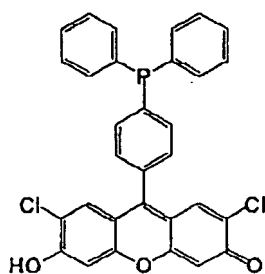
具体的な化合物としては、下記3の構造式で表されるものを挙げるができる。

【0012】

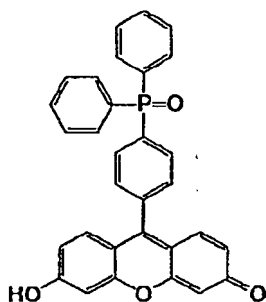
【化3】



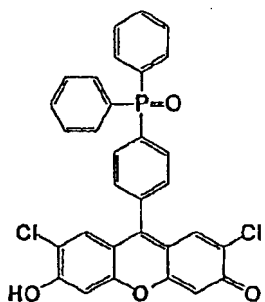
TPP-HF1



TPP-HF2



TPPO-HF1



TPPO-HF2

TPP-HF、TPPO-HF類

【0013】A：TPP-HF1およびTPPO-HF1の合成

2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの合成

1. β-レゾルシン酸6.00g (38.9mmol)、レゾルシノール6.10g (55.4mmol)、新たに乾燥した塩化亜鉛25g (180mmol)、オキシ塩化リン32ml (340mmol)を12時間室温で攪拌、反応液を氷水にあげ、沈殿を濾取し、2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンを得た。収量、8.40g、収率87.3%、水より再結晶、赤色針状晶、融点、196-198℃。

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 6.30 (2H, d, J=2.2Hz) 6.31 (2H, dd, J=2.2, 9.2Hz), 7.71 (2H, d, J=9.2Hz), 11.26 (4H, br)

2. 3,6-ジヒドロキシキサント-9-オンの合成

2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン1.00g (4.03mmol)に水50mlを加え、2日間オートクレーブ中で200-220℃に加熱する。室温まで放冷した後、生成した沈殿を濾取し、3,6-ジヒドロキシキサント-9-オンを得た。橙色粉末、収量720mg、収率76.9%

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 6.82 (2H, d, J=2.0Hz) 6.86 (2H, dd, J=2.2, 8.6Hz), 7.98 (2H, d, J=8.6Hz), 10.75 (2H, s)

3. 3,6-ビス (t-ブチルジメチルシリロキシ) キサント-9-オンの合成

3,6-ジヒドロキシキサント-9-オン1.73g (7.50mmol)を無水ジメチルホルムアミドに溶かす。イミダゾール5.10g (75.0mmol), t-ブチルジメチルクロロシリロキサン6.75g (45.0mmol)を添加し、室温で2時間攪拌する。反応液

はトルエンで希釈し、充分に水で洗浄後MgSO₄を加えて乾燥し、真空減圧溜去により白色固体として3,6-ビス (t-ブチルジメチルシリロキシ) キサント-9-オンを得た。収量、3.35g、収率96.5%、エタノールより再結晶、無色針状晶、融点151-154℃

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ: 0.29 (s, 12H) 1.01 (s, 18H), 6.83-6.87 (m, 4H), 8.20 (d, 2H, J=7.3Hz)

30 4. TPP-HF1の合成

4-ブロモフェニルジフェニルホスフィン102mg (0.30mmol)を無水2-メチルテトラヒドロフラン6mlに溶解する。これを液体窒素とイソペンタンの混合液に浸して-150℃に冷却する。t-ブチルリチウム (1.5M, n-ペンタン溶液) 0.22ml (0.33mmol)を加え、ハロゲン化リチウム化する。これに1.3)で合成した3,6-ビス (t-ブチルジメチルシリロキシ) キサント-9-オン274mgをテトラヒドロフランに溶かしたものを滴下し、温度が-130℃を越えないようにしながら更に30分攪拌する。その後反応液に水を加えてリチウム塩を分解し、室温まで温度を下げる。エチルアセテートで2回抽出し、集めた有機層を飽和食塩水で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧溜去する。残留物に酢酸を加え室温で攪拌し、保護基を切断すると共に脱水反応により生成物として、TPP-HF1を得た。真空減圧溜去により酢酸を除き、シリカゲルカラム (ジクロロメタン: メタノール) により生成する。収量、59mg、収率41.7%、ジクロロメタン: メタノールより再結晶、橙色針状晶

50 ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 6.63 (m, 4H), 7.06

(d, 2H, J=9.3Hz), 7.3-7.5(m, 14H), FAB MASS 473(M⁺ + 1)

5. TPPO-HF1の合成

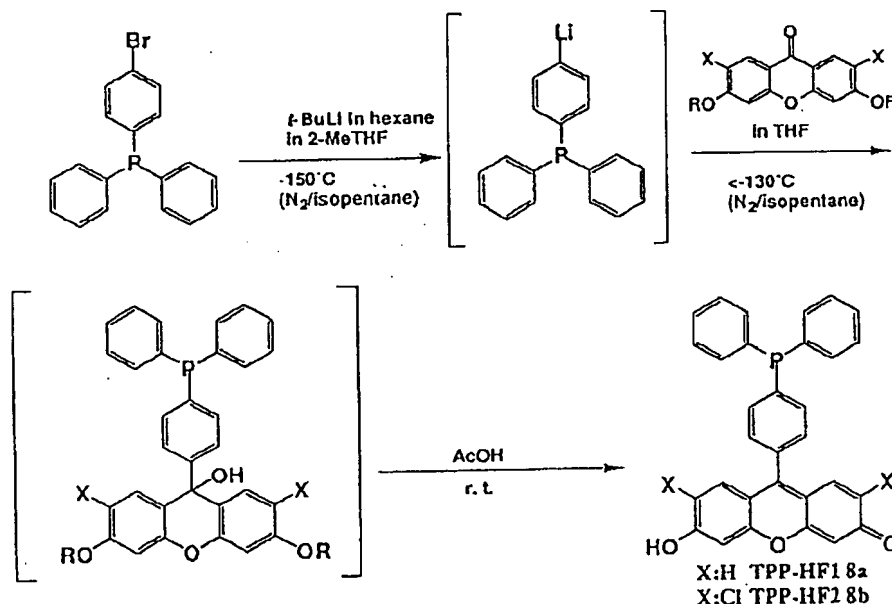
47mg (0.1mmol)のTPP-HF1をメタノールに溶かし、30% H₂O₂水溶液を加え、室温で攪拌する。減圧溜去によりH₂O₂とメタノールを除きTPPO-HF1を定量的に得る。エタノールより再結晶、赤色針状晶

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 6.47 (d, 2H, J=2.0Hz), 6.50 (dd, 2H, J=2.1, 9.2Hz), 6.97 (d, 2H, L=9.2), 7.5-7.9(m, 14H), FAB MASS 489(M⁺ + 1)

TPP-HF類及びTPPO-HF類の反応式を下記4及び5に示す。

【0014】

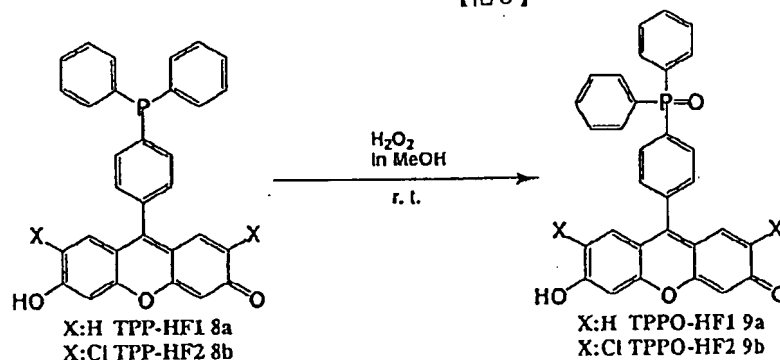
【化4】



TPP-HF類の合成反応式

【0015】

【化5】



TPPO-HF類の合成反応式

【0016】B: TPP-HF2およびTPPO-HF2の合成

1. 5-クロロβ-レゾルシン酸の合成

β-レゾルシン酸25g (0.16mol)を酢酸400mlに溶かし、SO₂Cl₂13ml (0.16mol)を加え、室温で攪拌する。反応終了後、反応液に水を加え、酢酸エチルで3回抽出した後、酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄で乾燥し、溶媒を真空下、減圧溜去すると目的物が得られた。収量22g、収

率72.3%、水より再結晶、無色針状晶

¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 6.47 (1H, s), 7.66 (1H, s), 11.20 (2H, s), 11.22 (1H, br)

2. 5,5'-ジクロロ-2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの合成

5-クロロβ-レゾルシン酸19g (98mmol), 4-クロロレゾルシノール23g (160mmol), 新たに乾燥した塩化亜鉛56g (410mmol), オキシ塩化リン93ml (990mmol)を1時間、70-80℃に加熱する。反応液を氷水にかけ、沈殿を濾

取し、5,5'-ジクロロ-2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンを得た。収量、5.1g、収率16.5%、水より再結晶、赤色針状晶

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 6.55 (2H, s) 7.28 (2H, s), 11.16 (2H, s), 11.22 (2H, s)

3. 2,7-ジクロロ-3,6-ジヒドロキシキサンテ-9-オンの合成

5,5'-ジクロロ-2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン1.3g(4.1mmol)に水50mlを加え、3,6-ジヒドロキシキサンテ-9-オンの場合と同様にして2,7-ジクロロ-3,6-ジヒドロキシキサンテ-9-オンを得た。収量1.0g、収率84.2%

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 7.03 (2H, s) 8.00 (2H, s), 11.21 (2H, s)

4. 3,6-ビス(t-ブチルジメチルシリロキシ)-2,7-ジクロロキサンテ-9-オンの合成

2,7-ジクロロ-3,6-ジヒドロキシキサンテ-9-オン777mg (2.62mmol)を無水ジメチルホルムアミド70mlに溶かす。イミダゾール1.78g(26.2mmol), t-ブチルジメチルクロロシリロキサン2.37g(15.7mmol)を添加し、3,6-ビス(t-ブチルジメチルシリロキシ)キサンテ-9-オンと同様にして3,6-ビス(t-ブチルジメチルシリロキシ)-2,7-ジクロロキサンテ-9-オンを得た。収量1.26g、収率91.6%、エタノールより再結晶、無色針状晶

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 0.33 (s, 12H) 1.07 (s, 18H), 6.90 (s, 2H), 8.29 (s, 2H)

5. TPP-HF 2の合成

4-ブロモフェニルジフェニルホスフィン307mg (0.90mmol)を無水2-メチルテトラヒドロフラン18mlに溶解する。t-ブチルリチウム(1.5M, n-ペンタン溶液)0.66ml(0.99mmol)、3,6-ビス(t-ブチルジメチルシリロキシ)-2,7-ジクロロキサンテ-9-オン822mg(1.8mmol)のテトラヒドロフラン溶液を用いてTPP-HF 1と同様にしてTPP-HF 2を得た。収量40.3mg、収率8.3%、ジクロロメタン:メタノールより再結晶、赤色針状晶

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 6.48 (s, 2H) 7.00 (s, 2H), 7.3-7.5 (m, 14H), FAB MASS 542(M^+ +1)

6. TPPO-HF 2の合成

54mg (0.1mmol)のTPP-HF 2をメタノールに溶かし、30% H_2O_2 水溶液を加え、室温で攪拌する。減圧溜去により H_2O_2 とメタノールを除き、TPPO-HF 2を定量的に得る。ジクロロメタン:メタ

ノールより再結晶、ダーク赤色針状結晶

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 6.62 (s, 2H) 7.04 (s, 2H), 7.6-7.9 (m, 14H), 10.79 (s, 1H), FAB MASS 558(M^+ +1)

【0017】TPP-HF類の物性

A: 前記合成のTPP-HF類及びTPPO-HF類の蛍光スペクトル

合成したTPP-HF類およびTPPO-HF類の3次元蛍光スペクトルを測定した。測定は0.1Mナトリウムリン酸バッファー(pH 7.8)中、TPP-HF、TPPO-HF類の濃度10 μM で行った。結果を図1の(I), (II)および図2の(I), (II)に示す。TPP-HF 1、TPP-HF 2のいずれの場合にも、中性条件下において酸化体であるTPPO-HF類の方が著しく蛍光強度が大きくなっていた。

【0018】TPP-HF類およびTPPO-HF類の蛍光のpH依存性

TPP-HF類を生理的条件下で用いるためには中性領域で安定な蛍光を示す必要があるため、TPP-HF、TPPO-HF類の蛍光のpH依存性を検討した。測定は、50mMナトリウムリン酸溶液中、20℃で行った。50mMの $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 H_3PO_4 の水溶液を調製し、それらを任意の割合で混合して、様々なpHのリン酸溶液とした。測定直前に各化合物の2mDMF溶液を添加して、蛍光を測定した。TPP-HF、TPPO-HF類の最終濃度は1 μM とした。測定結果を図3、および図4に示す。励起波長、蛍光波長はそれぞれ、TPP-HF 1 (Ex. 495nm/Em. 520nm)、TPPO-HF 1 (Ex. 495nm/Em. 525nm)、TPP-HF 2 (Ex. 507nm/Em. 527nm)、TPPO-HF 2 (Ex. 509nm/Em. 533nm)で行った。

【0019】Kaleida Graphで下記の計算式に一致(fit)させて、pKa値を算出した。その結果を表1に示す。

pKa値の算出

$$F = F_{\text{max}} / (1 + 10^{(\text{pKa} - \text{pH})}) + F_{\text{min}} / (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})})$$

F = 蛍光強度 (Fluorescence Intensity)

F_{max} = 最大蛍光強度 (Maximum Fluorescence Intensity)

F_{min} = 最小蛍光強度 (Minimum Fluorescence Intensity)

【0020】

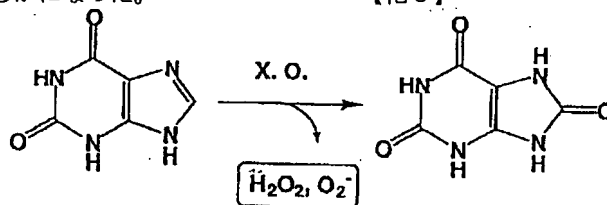
【表1】

	pKa	Fmax	Fmin	R
TPP-HF1	7.94	292	14.5	0.996
TPPO-HF1	6.29	292	71.0	0.994
TPP-HF2	7.61	667	36.1	0.991
TPPO-HF2	4.91	744	31.3	0.998

【0021】前記図3、および図4からTPP-HF類はpH8よりも酸性領域では著しく蛍光強度が小さく、逆にアルカリ性領域ではTPPO-HF類と同程度の蛍光強度を有していることがわかった。前記した、pH 7.4のリン酸バッファー中で観察された蛍光強度の違いは、TPP-HF、TPPO-HFそれぞれの化合物のpKa値に依存した現象であり、結果としてTPPO-HFに変化することにより中性付近で蛍光強度が増加することが明らかになった。

【0022】TPPO-HF類の蛍光の濃度依存性定量測定の可能性

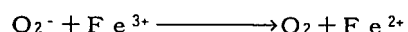
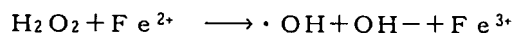
TPP-HF類が定量の目的に使用可能かどうか、TPPO-HF類の蛍光強度の濃度依存性を調べることにより、検討した。pH7.4のナトリウムリン酸バッファー中、TPPO-HF類の濃度を変化させて蛍光強度を測定した。結果を図5に示す。TPPO-HF類の蛍光はTPPO-HF類の濃度と相関しており、定量に用いることが可能であることが明らかになった。



キサンチン/キサンチンオキシダーゼによる
活性酸素生成機構

【0026】この系は活性酸素生成系として最もよく知られており、活性酸素を生成する酸化酵素として代表的なものである。しかしながら活性酸素の生成機構の詳細は不明な点が多く、それとともに(X.O.+X)系から直接H₂O₂が生成することもあまり知られていない。一方、H₂O₂とスーパーオキシド(O₂⁻)が同時に存在すると、微量に存在する鉄イオンの触媒によってHaber-Weiss反応が進行し、ヒドロキシルラジカル(・OH)が生成するその反応は反応式Aのとおりである。

反応式A



すなわち、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系ではH₂O₂とO₂⁻の他に、バッファーの塩に微量に含まれる鉄イオンの触媒で・OHも生成していることになる。

【0027】このように、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系では生体で生成する主な活性酸素であるH₂

【0023】これまでの検討の結果、励起・蛍光波長が長波長であること、また中性付近におけるTPPO-HF類の蛍光強度が安定していることなどからTPP-HF1と比較してTPP-HF2の方が蛍光検出試薬としては優れている。

【0024】TPP-HF1と活性酸素の反応(キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系) 1)キサンチン/キサンチンオキシダーゼ(Xanthine/Xanthine Oxidase)系について。

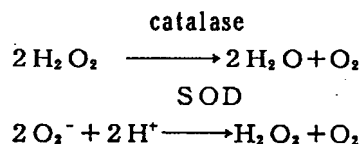
キサンチンオキシダーゼ(X.O.)は分子量275,000、2個のサブユニットからなり、1サブユニット中、1個のMoイオン、1個のFAD、2個の非ヘム鉄-硫黄タンパクを有する。X.O.はキサンチン(X)あるいはヒポキサンチンを尿酸に酸化すると同時に、酸素からスーパーオキシド(O₂⁻)と過酸化水素(H₂O₂)を生成する。下記6はその化学反応である。

【0025】

【化6】

O₂、O₂⁻、・OHが同時に存在しており、この系にTPP-HF1を応用すれば、生理的条件下での活性酸素との反応性を調べることができると考え、検討を行うことにした。同時に、H₂O₂、O₂⁻のそれぞれに対する阻害剤であるカタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)を添加することにより、TPO-HF1が特定の活性酸素種に対してどのように反応するかも併せて検討した。カタラーゼ、SODによってH₂O₂、O₂⁻がそれぞれ阻害される機構は下記Bの反応式のとおりである。

反応式B



X.O.から生成するO₂⁻とH₂O₂の比率は条件により大きく変動する。例えば酵素濃度が上昇するにつれてO₂⁻の生成比率が増しH₂O₂は減少する。基質濃度によ

でも変わる。pHによっても影響される。ここではフリドビッチ (Fridovich) らによって示された条件に従って実験を行った。この条件下では、 O_2^- と H_2O_2 が等量 (およそ $1.2 \mu M/min$.) 生成する。

【0028】2) TPP-HF1の反応性の検討

TPP-HF1をフリドビッチ (Fridovich) らによって示された条件の下、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系に応用し、活性酸素との反応性を検討した。キサンチン $50 \mu M$ を含むバッファー (0.1 mM EDTA を含む $50 mM$ カリウムリン酸バッファー、pH 7.8) 中にTPP-HF1が最終濃度 $10 \mu M$ となるように溶液を調製し、X. O. を添加して反応を開始した。

酸化によって生成するTPPO-HF1の蛍光強度の時間変化を測定した結果を図6に示す。

a) にみられるように、X. O. 添加によって蛍光強度が時間と共に増加した。

b) X. O. を添加しなかった場合 (ブランク) には蛍光強度の変化はみられなかった。また、

c) H_2O_2 、 O_2^- の阻害剤であるカタラーゼ、

d) SODを添加すると、蛍光強度の増加が抑制された。対照実験として酵素を加熱して失活させたものを添加しても、蛍光強度に影響はみられなかった。

【0029】カタラーゼによって酸化が抑制されたことから、反応には H_2O_2 が必要であることがわかる。一方、SODは O_2^- の不均化反応を行い H_2O_2 を生成する。 H_2O_2 によって酸化が進行するのであれば、SODの添加によって酸化反応が促進されることが予想される。しかしd)の結果でSODによっても蛍光強度の増加が抑制されたことから、酸化反応には O_2^- も必要であることが示唆される。キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系では生成する活性酸素の量は先にも記したように1分間に数 μM 程度と低濃度であり、このような条件下ではTPP-HF1の酸化反応は H_2O_2 や O_2^- ではほとんど進行せず、観察されたTPPO-HF1の蛍光強度の増加は主に $\cdot OH$ によるものである可能性が大きい。また、X. O. を添加してしばらくして蛍光増加が始まり蛍光強度の変化がS字曲線を描いていることも、2次的に生成した $\cdot OH$ による反応であることを示唆している。以上のことから、TPP-HF1類は H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ の3種の活性酸素の中では $\cdot OH$ に対して高い反応性を有しており、 $\cdot OH$ に対して特異性を示すことが明らかになった。また、本系には酵素としてタンパクが共存しているが、TPP-HF1の蛍光はタンパクの影響を受けなかった。

【0030】3) TPPO-HF1生成の確認

キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系によりTPPO-HF1が生成する過程を蛍光スペクトルの変化によって追跡した。前述2)の条件と同様に、X. O. の添加によって反応を開始した。開始後数分ごとの蛍光スペクトルを測定した結果を図7に示す。酸化反応が進行する

につれ、蛍光強度が増加すると共に、極大蛍光波長が $5 nm$ 程度長波長側にシフトし、最終的にTPPO-HF1のスペクトルと一致した。この結果は前記のTPP-HF、TPPO-HFの物理的性質と一致しており、反応の結果TPPO-HF1が生成したことが確認された。

【0031】TPP-HF1と様々な活性酸素種の反応 (化学反応系)

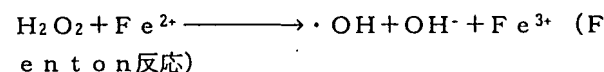
TPP-HF1と過酸化水素の反応

前記のキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系での検討ではTPP-HFはヒドロキシルラジカルに対し高い反応性をみせ、過酸化水素とはほとんど反応しなかったが、ここでは直接過酸化水素を加えてTPP-HF1との反応性を検討した。TPP-HF1を $50 mM$ カリウムリン酸バッファー (pH 7.8) に最終濃度 $10 \mu M$ となるように溶かし、励起波長 $495 nm$ 、蛍光波長 $525 nm$ での蛍光の経時変化を測定した。3分後、過酸化水素を添加し反応を開始した。反応開始後の蛍光の経時変化は60分間測定した。結果を図8に示す。結果より、TPP-HF1は $10 \mu M$ の過酸化水素に対しては反応速度が非常に遅いことがわかった。キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系のように数 μM 程度の過酸化水素しか生成しない場合にはほとんど蛍光増加はみられず、生体内に適用することを考えた場合、存在する μM オーダーの過酸化水素とはほとんど反応しない。

【0032】TPP-HF1とヒドロキシルラジカルの反応

1) Fenton反応について

化学反応系でヒドロキシルラジカルを生成する系としてはFenton反応



が最も有名である。Haber-Weiss反応と異なるのは、還元剤であるスーパーオキシドが存在しないことであり、2価の鉄イオン (Fe^{2+}) が過酸化水素と反応して、3価の鉄イオン (Fe^{3+}) とヒドロキシルラジカルが生成する。 Fe^{2+} は純水中では比較的安定であるが、中性のリン酸バッファー中では極めて不安定で、酸素によって30秒以内という速さで速やかに酸化されてしまう (自動酸化)。そのため、 Fe^{2+} を自動酸化から保護のため、キレート剤DTPA (diethylenetriamine pentaacetate) を用いた。

【0033】2) TPP-HFの反応性の検討

測定は、0.1 mMを含む $50 mM$ カリウムリン酸バッファー中にTPP-HF1を最終濃度 $10 \mu M$ となるように溶液を調製し、 Fe^{2+} と過酸化水素を同時に添加して反応を開始した。 Fe^{2+} は $50 \mu M$ とし、過酸化水素濃度は $10 \mu M$ とした。 Fe^{2+} は純度の高い $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ を用いた。ブランクとして、 Fe^{2+} だけ、あるいは過酸化水素だけを添加したものも測定し

た。結果を図9に示す。(図中a)は、 Fe^{2+} と過酸化水素の同時添加の場合、b)は過酸化水素のみの場合、c)は Fe^{2+} だけの場合、そしてd)はブランクである。)

a)の系では、 Fe^{2+} と過酸化水素添加により急激に蛍光強度が増加し、最大値に達した。b)の過酸化水素のみのときおよびc)の Fe^{2+} のみを加えた場合と比較してもその差は明らかである。

【0034】Fenton反応の結果より、TPP-HF1はヒドロキシルラジカルに対して高い反応性を有し、生体で生成する微量な活性酸素(H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$)に関してはヒドロキシルラジカルに対し、特異的に反応することが示された。

【0035】各活性酸素種に対するTPP-HF1の反応性の評価

前記各活性酸素種に対するTPP-HF1の反応性を検討したように、TPP-HF1は $\cdot\text{OH}$ に対して高い反応性を有していることが定性的に確認された。活性酸素種に対する選択性を定量的に評価する為、活性酸素 $10\mu\text{M}$ あたりのTPP-HF1の蛍光強度の増加量を比較した。Fenton反応で、過酸化水素 $10\mu\text{M}$ から生成する $\cdot\text{OH}$ による反応が完了した段階での蛍光強度変化を1として、それぞれの活性酸素種 $10\mu\text{M}$ あたりの蛍光強度変化を表した。 O_2^- は、寿命が5秒程度なので、添加直後の蛍光強度の増加量から求めた。一重項酸素($^1\text{O}_2$)とNOは、それぞれエンドパーオキシドEP-1(endoperoxide)とNO発生剤であるNOCl₃(Hrabie, J.A., J.Org. Chem., 58, pp.1472-1476, 1993参照)を用いた。それぞれの半減期(25分および13.7分)から、 $10\mu\text{M}$ 活性酸素を見積もり、TPP-HF1に対する反応性の相対比、すなわち、 $\cdot\text{OH}$ によるTPP-HF1の蛍光強度増加を1とし、他の活性酸素による蛍光強度増加を相対比Rとして求めた。その値を下記の表2に示す。

【0036】

【表2】

	活性酸素	R
a)	$\cdot\text{OH}$	1.0
b)	O_2^-	0.011
c)	$^1\text{O}_2$	0.13
d)	NO	0.050

【0037】

【発明の効果】以上述べたように、TPP-HF類はヒドロキシルラジカルと非常に鋭敏に反応することが確かめられたことから、特定の活性酸素種に特異的な蛍光酸化プローブが設計できることが理解され、反応部と蛍光部の構造の組み合わせ(置換基の選択も含めて)を設計することにより、特定の発生部位における、特定の活性酸素種の検出に適用できる蛍光酸化プローブが設計できることに道を開いたという点で、有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】(I)はTPP-HF1の3次元蛍光スペクトル、(II)はTPPO-HF1の3次元蛍光スペクトル

【図2】(I)はTPP-HF2の3次元蛍光スペクトル、(II)はTPPO-HF2の3次元蛍光スペクトル

【図3】TPP-HF1およびTPPO-HF1の蛍光のpH依存性

【図4】TPP-HF2およびTPPO-HF2の蛍光のpH依存性

【図5】TPPO-HF類の蛍光強度の濃度依存性

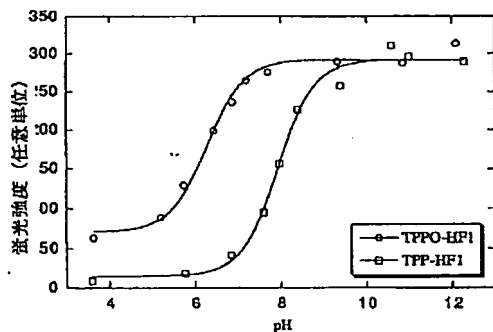
【図6】X. O. を添加後TPPO-HF1生成による蛍光強度の時間変化

【図7】X. O. の添加による反応の開始後の数分ごとの蛍光スペクトル

【図8】過酸化水素の添加による反応の開始後の蛍光の経時変化

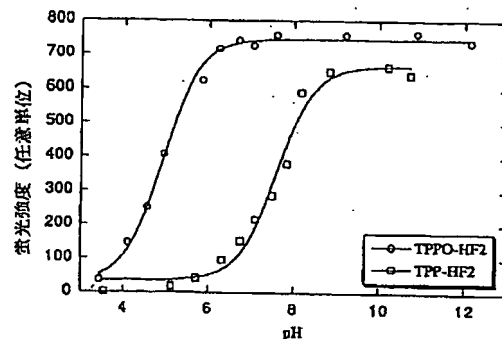
【図9】ヒドロキシルラジカルとTPP-HF1の反応性

【図3】



TPP-HF1およびTPPO-HF1の蛍光のpH依存性

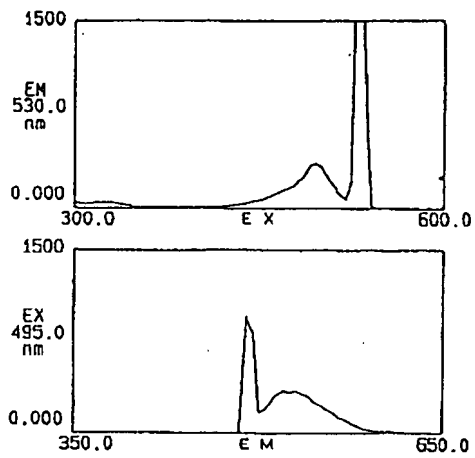
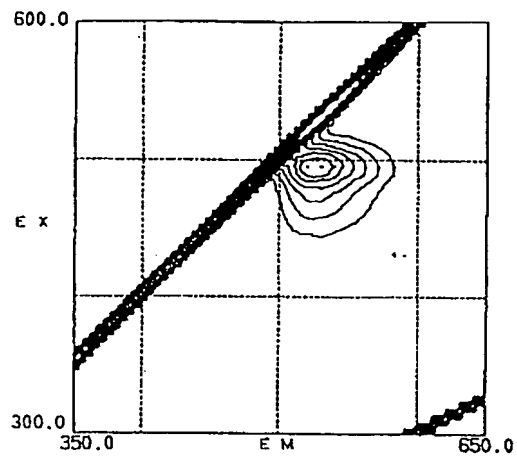
【図4】



TPP-HF2およびTPPO-HF2の蛍光のpH依存性

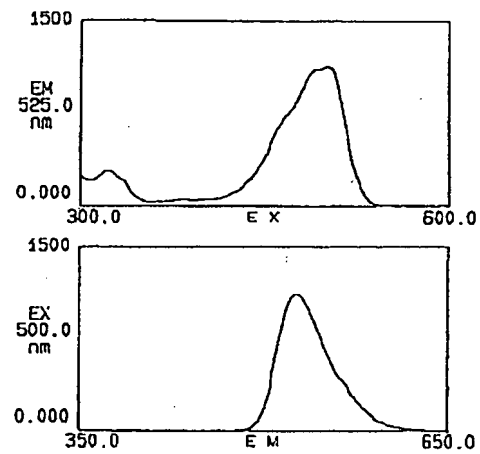
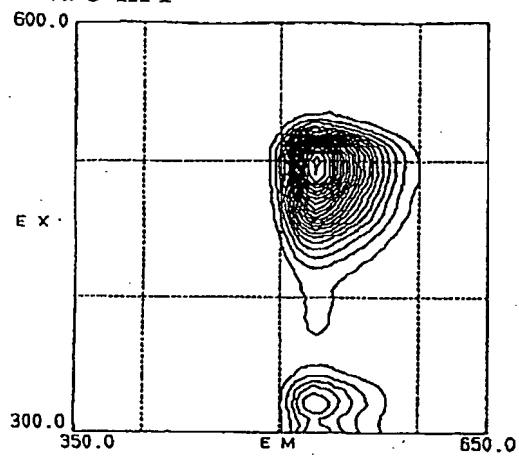
【図1】

TPP-HF1



(I)

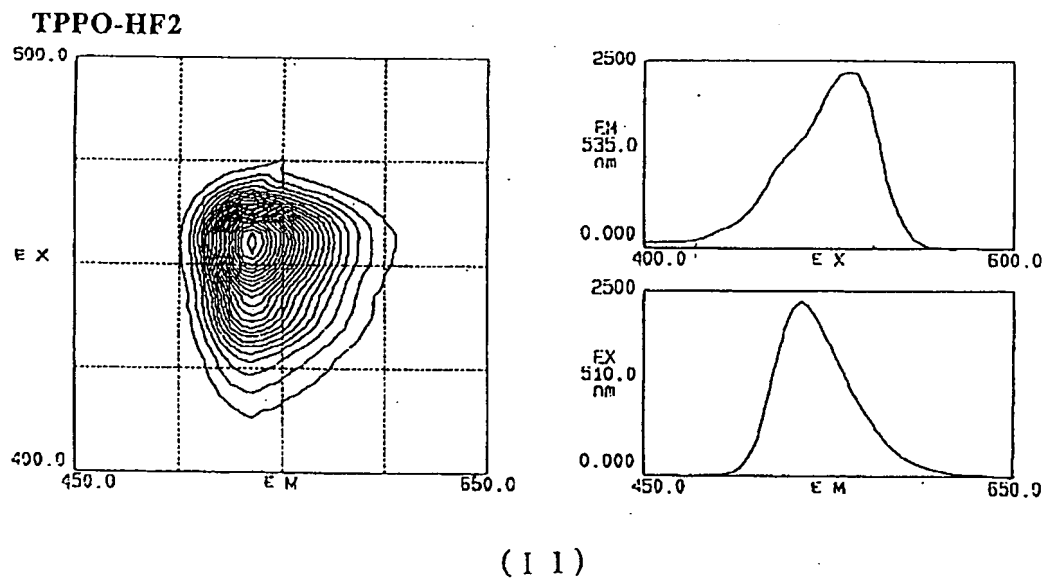
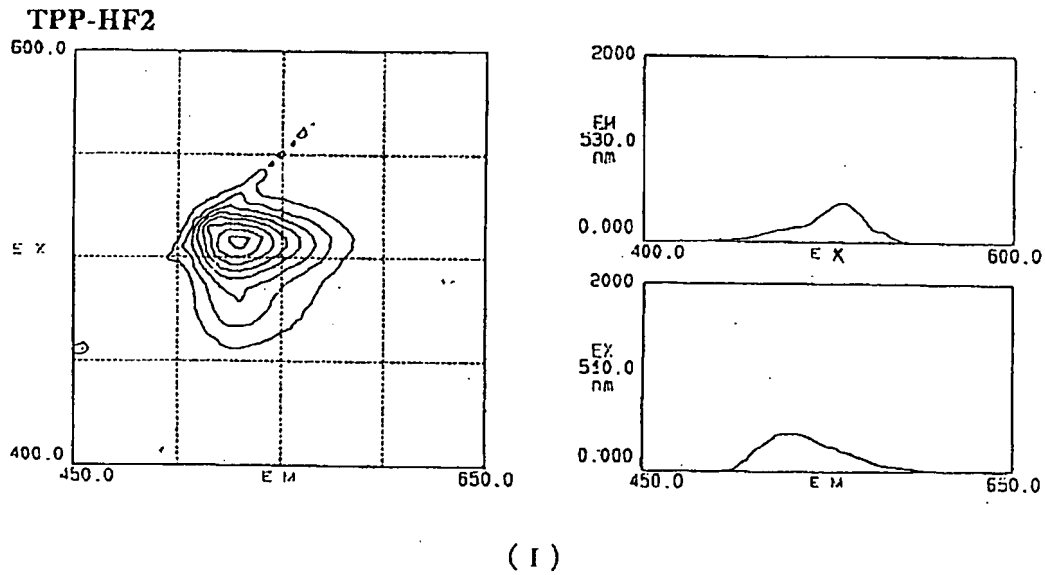
TPPO-HF1



(I I)

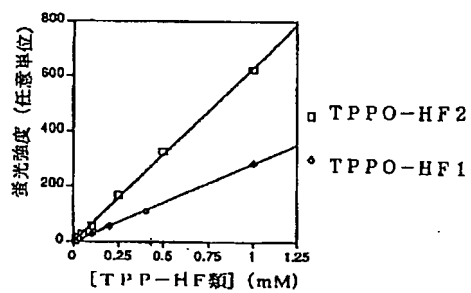
3次元蛍光スペクトル:

【図2】



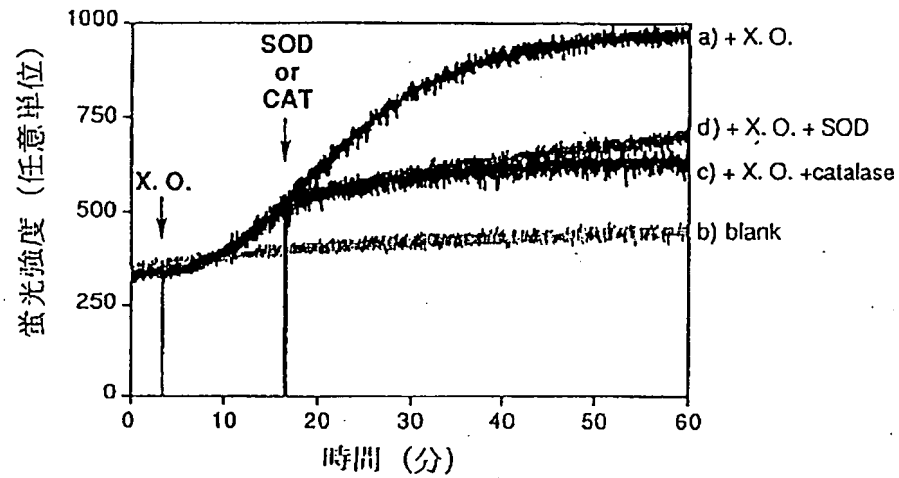
3次元蛍光スペクトル

【図5】



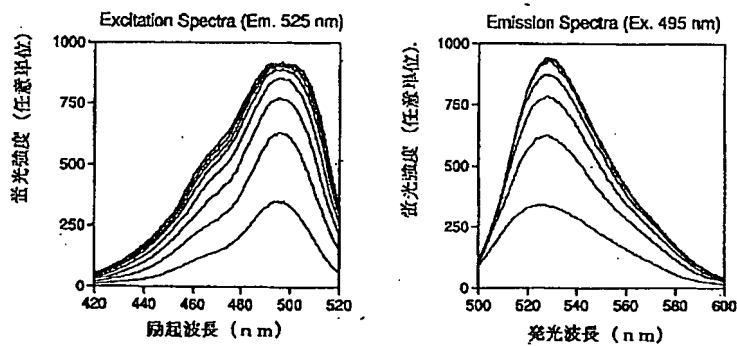
TPPO-HF類の蛍光強度の濃度依存性

【図6】



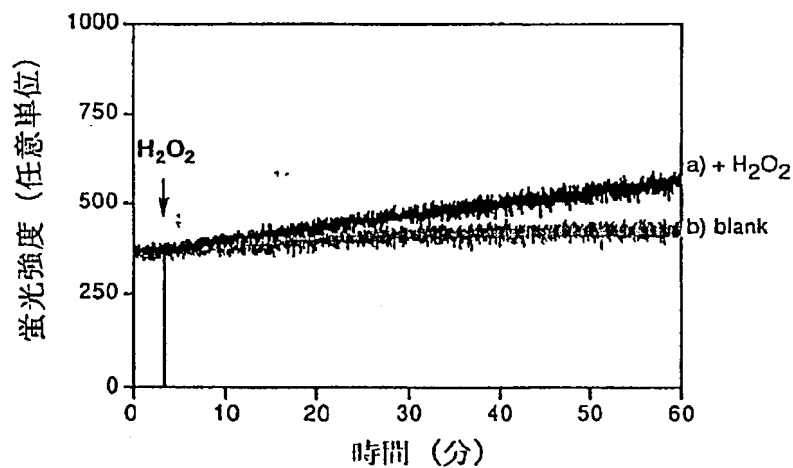
X. O. を添加後 T P P O - H F 1 生成による蛍光強度の時間変化

【図7】



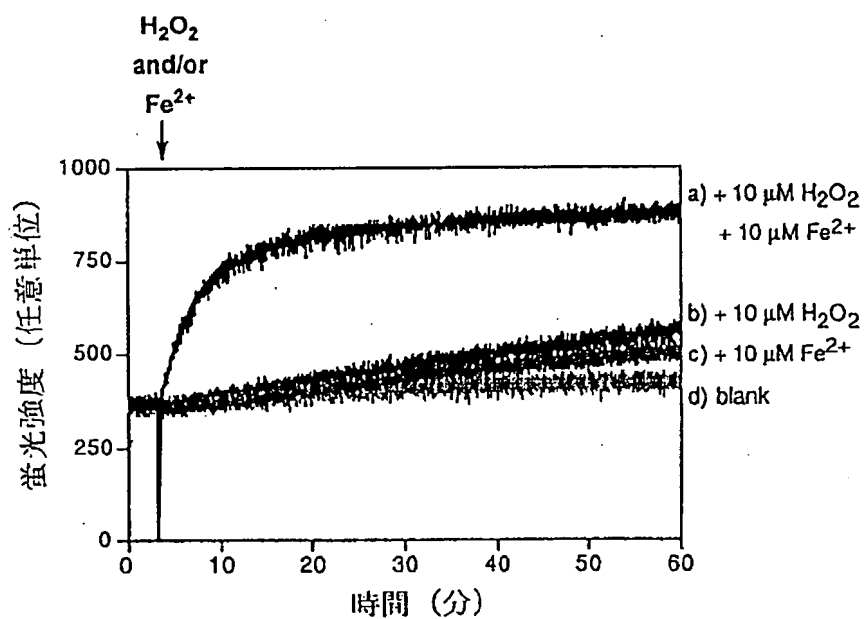
X. O. の添加による反応の開始後の数分ごとの蛍光スペクトル

【図8】



過酸化水素の添加による反応の開始後の蛍光の経時変化

【図9】



ハイドロキシルラジカルとTPP-HF1の反応性

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G042 AA01 BB11 BB20 BE03 CB03
 DA03 DA08
 2G054 AA10 AB10 CA07 CA30 CE02
 EA03 GA04 GB02
 4H050 AA03 AB20 AB92